

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 04121188
PUBLICATION DATE : 22-04-92

APPLICATION DATE : 07-09-90
APPLICATION NUMBER : 02238236

APPLICANT : SNOW BRAND MILK PROD CO LTD;

INVENTOR : NAKAMURA TETSUO;

INT.CL. : C12N 11/00 A61L 2/02 A61L 2/16

TITLE : METHOD FOR STERILIZING IMMOBILIZED ENZYME UTILIZING HIGH PRESSURE

ABSTRACT : PURPOSE: To simply and efficiently sterilize a microorganism attached to an immobilized enzyme without impairing activity of enzyme and requiring removal treatment of a germicide after sterilizing by applying high pressure to the immobilized enzyme in a high pressure device.

CONSTITUTION: A microorganism attached to an immobilized enzyme is sterilized without lowering oxygen activity by applying high pressure to the immobilized enzyme in a high pressure device. Preferably, the immobilized enzyme is packed in a bag made of synthetic resin together with distilled water and buffer and housed in a high-pressure device and then treated at $\geq 3000\text{kg/cm}^2$ pressure and $\geq 50^\circ\text{C}$ retaining temperature.

COPYRIGHT: (C)1992,JPO&Japio

THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑯ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A) 平4-121188

⑬ Int. Cl. 5

C 12 N 11/00
A 61 L 2/02
2/16

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成4年(1992)4月22日

Z 2121-4B
Z 7108-4C
Z 7108-4C

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全6頁)

⑮ 発明の名称 高圧を利用した固定化酵素の殺菌方法

⑯ 特 願 平2-238236

⑰ 出 願 平2(1990)9月7日

⑱ 発明者 宿野部 幸孝 埼玉県川越市南古谷上6083-8-B-2-205

⑲ 発明者 井手 武雄 埼玉県川越市田町23-35 サンハイツ川越303

⑳ 発明者 中村 哲郎 埼玉県入間市下藤沢580-5

㉑ 出願人 雪印乳業株式会社 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

㉒ 代理人 弁理士 藤野 清也

明細書

方法に関する。

1. 発明の名称

高圧を利用した固定化酵素の殺菌方法

2. 特許請求の範囲

(1) 固定化酵素に高圧装置内で高圧を適用して酵素活性を低下させ付着する微生物を殺菌することを特徴とする高圧を利用した固定化酵素の殺菌方法

(2) 高圧装置の高圧が 3,000kg/cm²以上である請求項(1)に記載の高圧を利用した固定化酵素の殺菌方法

(3) 高圧装置の保持温度が50℃以上である請求項(1)または(2)に記載の高圧を利用した固定化酵素の殺菌方法

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、固定化酵素に高圧装置内で高圧を通して固定化酵素に付着している微生物を殺菌することよりなる高圧を利用した固定化酵素の殺菌

従来の技術

従来、固定化酵素を使用して物質の生産あるいは改質が行われている。

しかし、固定化酵素を長期間使用していると固定化酵素に付着している細菌等の微生物が増殖し、その結果、分解物の微生物汚染固定化酵素の活性の低下、あるいは処理効率の低下等の問題が生じてくる。

このような点を改善するために、固定化酵素を殺菌剤あるいは洗浄剤で洗浄する方法が行われていた。例えば、特開昭56-92791号公報には、固定化酵素をジオクチルエレントリアミン等の置換ジエチレントリアミンの希薄水溶液と接触させて殺菌する方法が、また特開昭59-175879号公報には、細菌で汚染された酵素を多価アルコールに浸漬して殺菌する方法が、さらに特開昭59-98689号公報には固定化酵素をラウリルベンゼンスルホン酸塩とエタノールとを含む混液で処理して固定化

特開平4-121188 (2)

酵素を洗浄殺菌する方法が開示されている。しかし、これらの固定化酵素を殺菌剤や洗浄剤で洗浄殺菌する方法は、その洗浄殺菌に長時間を要したり、あるいは洗浄殺菌効率が必ずしも充分ではなく、また固定化酵素の活性を低下させたり、洗浄殺菌後固定化酵素に残存付着している洗浄剤あるいは殺菌剤を完全に除去する操作を必要とするなどの種々の解決しなければならない問題点があった。

また、特開平1-228454号公報では、固定化酵素に紫外線を照射して付着する微生物を殺菌する方法が開示されている。しかし、紫外線照射で固定化酵素に付着している微生物を完全に殺菌することは困難であった。

発明が解決しようとする課題

本発明は、このような従来に行われている固定化酵素の殺菌方法の問題点を解決することを目的としてなされたものである。

すなわち、本発明の目的は、効率よく、しかも

固定化酵素の活性を損ねずに固定化酵素に付着する微生物を殺菌する新規な方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

本発明者らは、上記課題を解決するために固定化酵素に適用できる種々の殺菌方法について検討をしたところ、固定化酵素を高圧装置に入れ、高圧を適用すると、固定化酵素の酵素活性を損なうことなく固定化酵素に付着している微生物だけを殺菌することができることを見出し、本発明をなすに至った。

すなわち、本発明は、固定化酵素に高圧装置内で高圧を適用して酵素活性を低下させることなく付着する微生物を殺菌する方法に関する。

本発明では、固定化酵素として従来知られている種々の固定化酵素が用いられる。このような固定化酵素としては、ラクターゼ、グルコースイソメラーゼ、プロテアーゼ等を水に不溶性の担体、例えばキトサン、キチンあるいは樹脂等に化学結

合させるかあるいはセルローストリアセテート、ポリアクリルアミドゲル等に包括させて固定化させたものを例示することができる。これらは、バルクの状態であってもカラム等に充填された状態であっても機械構に収納された状態であってもあるいは流動層、膜型等となった状態であってもさらにこれらの装置から固定化酵素を取り出した状態であっても使用することができる。

高圧装置は、従来食品等の高圧装置として知られている装置を使用することができる。このような装置としては、例えば、三菱重工業製高圧試験装置がある。この装置によると、圧力媒体として水を使用し最高圧力 $10,000\text{kg/cm}^2$ 、使用温度常温～ 60°C で高圧処理を行うことができる。また、鈴丸善発行、大杉治郎他著「高圧実験技術とその応用」第261頁(1980年)、食品資材研究会発行宮川金二郎著「食品の物性」第6集第99頁(1980年)等に記載されている高圧発生装置を用いることもできる。

本発明を完成させるに当り、次の高圧発生装置を用い実験を行った。

1. 高圧発生装置

三菱重工業株式会社製高圧試験装置を使用した。

(1) この装置の主な仕様は次の通りである。

- a) 最高仕様圧力 $10,000\text{kg/cm}^2$
- b) 使用温度 常温～ 60°C
- c) 処理室寸法 $54\text{mm} \times 200\text{mm}$
- d) 圧力媒体 水

(2) 次の試験条件で試験を行った。

- a) 圧力 0～ $4,000\text{kg/cm}^2$
- b) 温度 20～ 60°C
- c) 時間 0～30分

(3) 試料

(1) 酵素溶液(対照)。酵素溶液としてプロテアーゼS 100U/ ml をpH7.0のリン酸緩衝液に溶解し、10mlビニール製シールバック材に封入したもの用いた。

(2) 固定化酵素。前記プロテアーゼSをキトサ

ンピーズ(キトバール、商品名)にグルタルアルデヒドで架橋した固定化酵素を用い、これをカゼイン液液中に浸漬して汚染させたものを使用した。この汚染固定化酵素を蒸留水で水洗して前処理し、この5g・wetを5mM酢酸カルシウム水溶液10mlとともにビニール製シールバック材に封入したもの用いた。

これらの試料は、それぞれ6パックずつ使用した。

(3) 試験方法

上記試料を高圧発生装置に入れ、(1)高圧を適用したときの圧力の変化による酵素の残存活性及び生菌数、(2)高圧を適用したときの温度の変化による酵素の残存活性及び生菌数、(3)さらに、時間の経過による酵素の残存活性及び生菌数について試験した。

(4) 試験結果

前記実験を行った結果を第1～6図に示す。第1図によると、酵素液(対照)を0～4000

以上でいちじるしく低下している。このことから、高圧装置の保持温度は50℃以上が好適である。

さらに、高圧装置の保持時間についてみると、第5図に示すように固定化酵素を圧力3000kg/cm²、温度60℃に保持したとき保持時間5～30分の間ではほとんど最初の活性が保持され、また第6図に示すように生菌数は5分間の保持ではとんどなくなることが分る。

これらの実験から、固定化酵素を高圧装置に保持し、高圧を適用すると、固定化酵素特有の性質としてその活性を損なわずに固定化酵素に付着する微生物を殺菌することができ、この殺菌効果は圧力3000kg/cm²以上、保持温度50℃以上のときに顕著であることが分る。

固定化酵素は、塩化ビニール、ポリエチレン等柔軟な合成樹脂製の袋に蒸留水、緩衝液と共に充填して高圧発生装置に収納し、高圧を適用するとよい。適用条件としては前記実験の結

果3000kg/cm²の高圧を適用するとその活性はいちじるしく低下するのに対し、固定化酵素に高圧を適用してもその活性はほとんど低下しないことが分かる。また、このさいの生菌数は、第2図にみられるように高圧発生装置の圧力が3000kg/cm²以上になるといちじるしく低下し、殺菌効果が生じている。このことから固定化酵素に高圧を適用するとその活性を低下させることなく殺菌を行うことができ、この殺菌効果は3000kg/cm²以上でいちじるしく高まることが分る。

次に、第3図によると、酵素液を高圧3000kg/cm²に10分間保持し、その間高圧装置の保持温度を20～60℃に保持すると、酵素液の場合酵素活性が最初の20℃のときからいちじるしく低下し、さらに温度が上昇するにつれてその活性は少しずつ低下しているのに対し、固定化酵素は温度が上昇しても活性はほとんど低下せず、最初の活性を維持できることが分る。またこのさいの生菌数は、第4図にみられるように50℃

以上でいちじるしく低下している。このことから、高圧装置の保持温度は50℃以上が好適である。

さらに、高圧装置の保持時間についてみると、第5図に示すように固定化酵素を圧力3000kg/cm²、温度60℃に保持したとき保持時間5～30分の間ではほとんど最初の活性が保持され、また第6図に示すように生菌数は5分間の保持ではとんどなくなることが分る。

これらの実験から、固定化酵素を高圧装置に保持し、高圧を適用すると、固定化酵素特有の性質としてその活性を損なわずに固定化酵素に付着する微生物を殺菌することができ、この殺菌効果は圧力3000kg/cm²以上、保持温度50℃以上のときに顕著であることが分る。

固定化酵素は、塩化ビニール、ポリエチレン等柔軟な合成樹脂製の袋に蒸留水、緩衝液と共に充填して高圧発生装置に収納し、高圧を適用するとよい。適用条件としては前記実験の結果から圧力3000kg/cm²、保持温度50℃以上とすると酵素活性を損なわずに殺菌を行うことができる。なお、高圧発生装置内で高圧の適用によって酵素活性が低下しないのは、前記実験の結果から酵素液では認められず固定化酵素特有の作用のように思われる。

このようにして高圧を適用した固定化酵素は、合成樹脂製の袋等から取り出し、蒸留水、緩衝液等で洗浄し、再び使用することができる。

本発明の方法は、牛乳をラクターゼを担体に固定化した固定化酵素を使用し、グルコースとラクトースとに分解するさいの固定化酵素の殺菌、あるいは同様に乳糖、ホエー等に作用させて乳糖分解乳、甘味シロップ製造のさいの固定化酵素の殺菌等に用いることができる。さらにプロテアーゼ、インメラーゼ等を担体に固定化した固定化酵素の殺菌等にも用いることができる。

次に本発明の実施例を示す。

実施例 1

カラム [6 cm(直径)×18 cm(長さ)]に、300 mLの固定化プロテアーゼSを充填し、これにダウンフローで10%カゼインを反応温度40°C、SV=3で連続通液を行った。時間経過と共に菌の生育が始まり、固定化酵素への乳タンパクの付着と細菌による汚染蓄積が生じた。12時間通液後、細菌数は10⁴オーダーとなった。このときカラムから固定化酵素を取り出し、リン酸緩衝液(pH7.0)で洗浄して乳固体分を除去した。これを5 mM酢酸カルシウム水溶液とともにビニール製シールバック材に封入し、高圧発生装置に充填し、圧力3000kg/cm²、保持温度50°Cで10分間高圧を適用した。その後、固定化酵素を袋から取り出し、無菌のリン酸緩衝液(pH7.0)で洗浄した。この酵素活性はほとんど低下せず、付着菌数は0に近い状態であった。この固定化酵素を再びカラムに充填し、脱脂乳の通液を開始した。

発明の効果

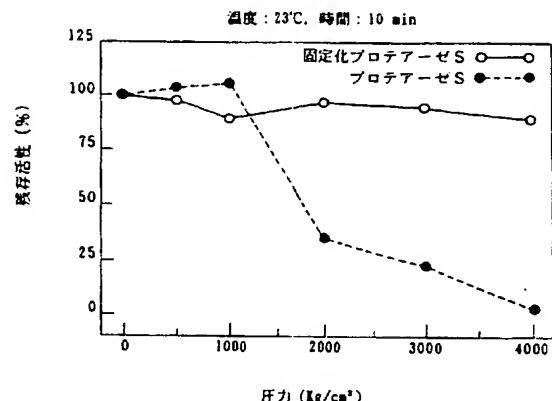
本発明の方法によると、固定化酵素に用いる担体の形状や構造が異なっていても固定化酵素に高圧を適用することにより酵素活性を低下させることなく、固定化酵素に付着し繁殖している細菌等の微生物を殺菌することができる。この方法は、殺菌剤、洗浄剤等を使用する化学的方法にくらべて殺菌後の固定化酵素の後処理が簡単で、しかも酵素活性の低下がほとんどみられず、殺菌効果が高く工業的に有利な固定化酵素の殺菌方法である。

4. 図面の簡単な説明

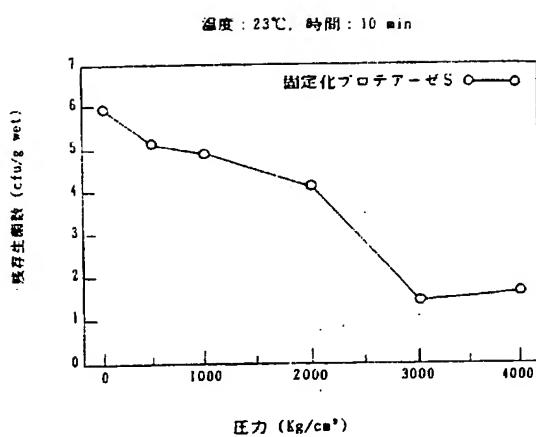
第1図は固定化酵素に高圧を適用したときの圧力と残存酵素活性との関係を、また第2図は、圧力と残存生菌数との関係を示す。第3図は、固定化酵素に高圧を適用したときの保持温度と残存酵素活性との関係を、第4図は保持温度と残存生菌数との関係を示す。第5図は同様に保持時間と残存酵素活性との関係を、第6図は保持時間と残存生菌数との関係を示す。

図中、○——○は、高圧を固定化酵素に適用した場合を、●···●は酵素溶液(対照)に適用した場合をそれぞれ示す。

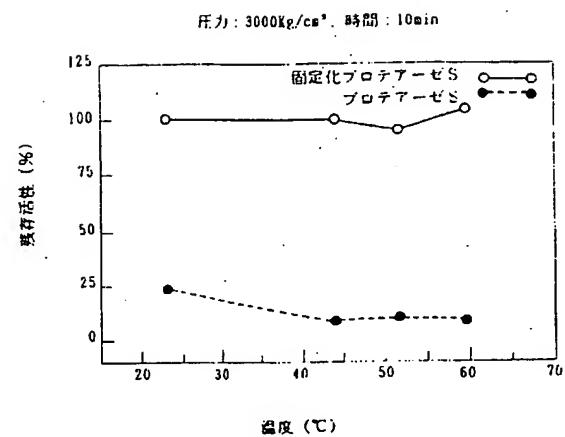
出願人 雪印乳業株式会社
代理人 藤野清也
代理人 宮田広豊



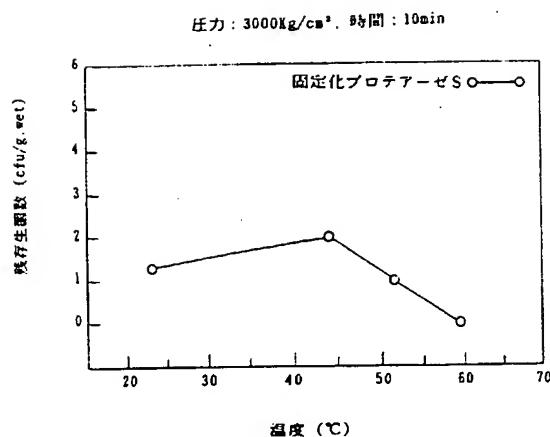
第1図



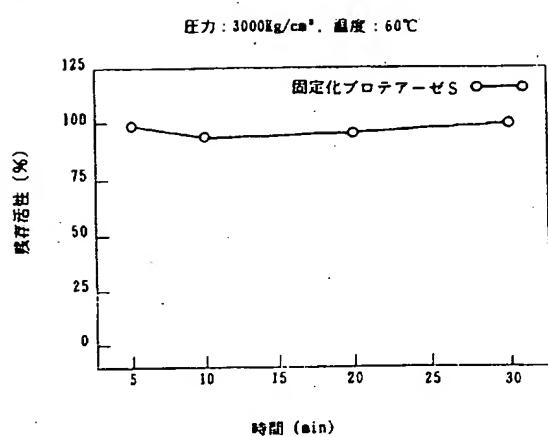
第2図



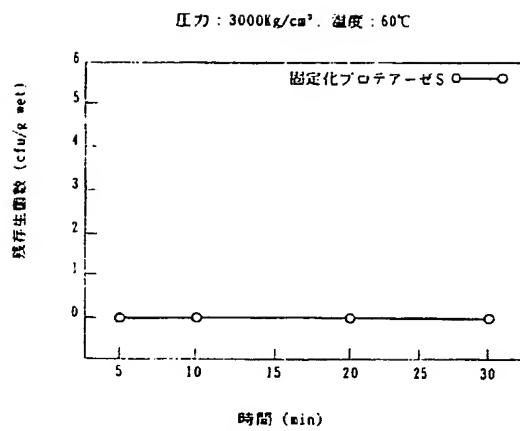
第3図



第4図



第5図



第6図